

2 Etiología de la enfermedad causada por *F. Oxysporum* en el cultivo de uchuva

Pedro Jiménez, Tatiana Sánchez, Paula Forero

Investigador Docente. Facultad de Ciencias Básicas,
Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, Colombia.

E-mail: pedro.jimenez@unimilitar.edu.co

RESUMEN

Para proponer una escala de severidad para la fusariosis en uchuva, aislamientos del género *Fusarium* fueron extraídos de plantas de uchuva que mostrasen síntomas. Una vez establecida la colección de hongos, se clasificaron y se inocularon en plantas sanas para observar el proceso de colonización y el progreso de la enfermedad. Se agruparon los síntomas de manera tal que permitieran establecer una escala gráfica de uso simple para la estandarización del tema. Un resultado no esperado fue la identificación de dos especies: *F. solani* y *F. pseudocircinatum*, las cuales no habían sido reportadas como inductoras de la enfermedad. Por último, es oportuno destacar que el presente trabajo es la primera propuesta para establecer en una escala los distintos grados de enfermedad por los que atraviesa la uchuva al experimentar fusariosis.

INTRODUCCIÓN

Uno de los géneros de hongos más importantes cuando se estudian enfermedades de plantas es *Fusarium*, debido a que ocasiona grandes pérdidas económicas a nivel mundial al inducir enfermedades sobre muchas especies (Nelson *et al.*, 1994; Olivain y Alabouvette, 1999; Fravel *et al.*, 2003). Quizás la más conocida de estas enfermedades es la marchitez vascular de las plantas, en la cual el hongo impide la traslocación de agua y nutrientes a lo largo de la planta conduciendo finalmente a la muerte del individuo (Schumann y D’Arcy, 2006). En Colombia, especies de este género afectan de manera importante flores y frutales de alta importancia comercial, como clavel, tomate, uchuva, etc. De esto se desprende que es necesario encontrar maneras de controlar al hongo, y debe comenzarse por conocerse la enfermedad y su desarrollo, no solo los síntomas finales de la misma. Dado que la uchuva fue un cultivo con gran crecimiento en los últimos años (Legiscomex, 2008), el cual se ha visto seriamente afectado por este hongo, se escogió para buscar una manera alternativa y efectiva de controlar la enfermedad.

Diferentes especies del género *Fusarium* ocasionan enfermedades, las cuales afectan diversos cultivos como plantas horticolas y en especial granos y cereales de importancia mundial como el arroz y maíz, entre otros (Nelson *et al.*, 1994). Sin



embargo, aunque se conocen muchos cultivos que han sido atacados por *Fusarium* sp, en especial por la especie *Fusarium oxysporum*, puede ser que aún no hayan sido reportados todos los potenciales hospederos de importancia agrícola (Gordon y Martyn, 1997), de ahí la importancia de estudiar cómo se desarrollan las enfermedades causadas por *Fusarium* en este tipo de cultivos.

Dentro de las enfermedades causadas por este género, las más representativas son las del tipo vascular; estas al afectar el transporte de agua y minerales a través del cuerpo del hospedero producen síntomas como marchitamiento, decaimiento y amarillamiento (Schumann y D’Arcy, 2006). La marchitez causada por la especie *Fusarium oxysporum* es muy importante, debido a su amplio rango geográfico, la persistencia del inóculo en el suelo y al alto número de hospederos susceptibles (Beckman, 1987). Esta probablemente es la especie de *Fusarium* más importante en términos económicos, puesto que puede afectar hasta el 90% de las plantas, como ha ocurrido en cultivos como el tomate. Al estar presente en el cultivo, esta especie induce la aparición de síntomas como la deshidratación de la parte apical hacia la parte basal (conocido como marchitez descendente), provocando la muerte de las plantas y por lo tanto pérdidas de gran importancia en la producción (Schumann y D’Arcy, 2006). Lo anterior afecta directamente a los productores, quienes no solo tienen una pérdida económica sino de tiempo y desgaste del suelo. Incluso si la enfermedad no perjudica a la producción total del cultivo, la calidad del producto puede estar comprometida, lo cual limita las posibilidades de mercadeo y restringe, en muchos casos, la oportunidad de exportación (CCI, 2005). Además, el control de *Fusarium* es difícil, en parte porque se encuentra en casi todo tipo de suelo y es un componente habitual de la microflora (Fravel *et al.*, 2003).

En el año 2003, la especie *Fusarium oxysporum* fue reportada como el patógeno causal de la marchitez vascular en el cultivo de la uchuva (Carreño, 2007). Es importante evaluar la enfermedad que *Fusarium* produce al cultivo de la uchuva, debido a la amplia aceptación en mercados internacionales y un potencial cada vez mayor (CCI, 2005), así como aportar información que eventualmente puede ayudar en la evaluación de biocontroladores. Dado que se desconocen detalles de la etiología de la enfermedad en este cultivo, el objeto de este trabajo fue aislar y reconocer los *Fusarium* asociados a plantas sintomáticas, determinar la patogenicidad de los aislamientos y describir el progreso de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron plantas de uchuva que mostraran signos avanzados de la enfermedad que pudieran explicarse por el ataque de *Fusarium* sp. (fusariosis). Las muestras provinieron de diferentes localidades del departamento de Cundinamarca: Granada, Sylvania y Pasca.

Aislamiento de los hongos

Se procedió a realizar una esterilización de la superficie de las muestras. Para ello se tomaron submuestras que incluyen 3 cm por encima y por debajo de la corona. Esos segmentos fueron sumergidos en una solución 5% de hipoclorito de sodio durante 3 mi-

nutos, después fueron enjuagados 5 veces con agua destilada estéril. Posteriormente se procedió a obtener secciones de 1 cm de longitud, las cuales se cultivaron en cajas de Petri sobre agar papa dextrosa a un cuarto de su concentración (APD 1/4).

Determinación taxonómica

Los diferentes aislamientos se inocularon sobre medio APD a concentración completa y agar Agua-Hoja de clavel (AHC) (Figura 7B) (Nelson *et al*, 1983; Leslie y Summerell, 2006); una vez desarrollados fueron identificados mediante el uso de manuales de identificación de *Fusarium* utilizando la observación de sus estructuras, como recomiendan Leslie y Summerell (2006).

Pruebas de patogenicidad

Preparación de inóculos

Los aislamientos fueron reactivados, cultivándolos en cajas de Petri con APD a $\frac{1}{4}$, y se les dejó crecer durante 8 días, cuando se cosechó para preparar una suspensión conidial, que serviría para las pruebas de patogenicidad.

Las suspensiones se elaboraron añadiendo 2 ml de agua destilada estéril (ADE) a la caja de Petri; sobre el micelio de cada hongo y con ayuda de un asa bacteriológica, se rasparon las superficies del medio separando así las macro y microconidias, suspendiéndolas en el agua. Este volumen era retirado de la caja y se realizaron dos lavados adicionales, cada uno con 3 ml de ADE para recolectar las conidias restantes.

A cada suspensión obtenida se le determinó el título, contando las esporas presentes en tres submuestras, utilizando una cámara de Neubauer Improved (Optik Labor). Conocido el título se corrigieron las concentraciones conidiales a 10^4 , 10^5 y 10^6 UFC/ml para las pruebas de patogenicidad, las cuales eran aplicadas en el suelo experimental a saturación, y como solución donde se sumergieron las raíces de las plántulas en las pruebas de patogenicidad.

Después de no encontrar diferencias significativas en las velocidades de infección utilizando las concentraciones mencionadas, y habiendo determinado que los títulos de inóculo en suelo alcanzaban concentraciones alrededor de 10^2 UFC/g de suelo, se prefirió utilizar el método de inoculación denominado salvado-grano (“Chaff-grain”). Este método consiste en la mezcla de granos de cereales, los cuales han sido pre-inoculados con el hongo, con el suelo en donde se establece la planta que se va a evaluar. En este estudio, el grano inoculado fue trigo y el protocolo de infección se encuentra reportado por Leslie y Summerell (2006), siendo ampliamente aceptado en este tipo de estudios.

Inoculación de suspensiones en plántulas de uchuva

El paquete radicular de 6 plántulas, presentando dos pares de hojas verdaderas expandidas, que iban a ser inoculadas con las suspensiones, fue previamente recortado (1/3 de la longitud). Posteriormente, las raíces fueron sumergidas en la suspensión correspondiente a cada tratamiento (10^4 , 10^5 y 10^6 UFC/ml), durante 5 minutos.

Así, fueron plantadas en sustrato no inoculado, se regaron cada tercer día con 30 ml de agua estéril por plántula y no se realizaron fertilizaciones. El sustrato en



cual se mantuvieron las plantas, correspondió al suelo utilizado para la germinación de las semillas (turba) y no se añadió suelo adicional o cascarilla de arroz durante el tiempo de evaluación. Este experimento se repitió 3 veces.

Evaluación de la presencia del hongo en el sistema vascular de las plántulas

Para evaluar la colonización interna de los aislados, 66 plántulas fueron plantadas en una bandeja de propagación de 144 alvéolos, manteniendo los grupos de 6 plántulas separados. En total se establecieron doce tratamientos para este ensayo, incluido el control. Los tratamientos consistieron en enfrentar cada grupo a un aislamiento del hongo.

A partir del décimo día, luego de la inoculación, se realizaron muestreos destructivos para determinar si los hongos inoculados lograban penetrar al sistema vascular de las raíces de las plántulas. Para determinar la presencia de los hongos en las plántulas, estas fueron extraídas de la bandeja de propagación y sus raíces se lavaron cuidadosamente con agua corriente. Se seccionó una porción de 3 cm a partir de la punta de la raíz hacia la corona, porción que fue esterilizada sumergiéndola durante tres minutos en hipoclorito de sodio al 0,2% y dos lavados posteriores con ADE de dos minutos cada uno.

Las muestras estériles fueron cortadas en porciones de 3 mm. Para cada tratamiento, una caja de Petri se dividió en dos y sobre medio APD $\frac{1}{4}$ se sembraron los trozos de dos plantas correspondientes al mismo tratamiento.

Una vez sembradas las porciones de raíz en el medio, las cajas se observaron al microscopio cada tercer día, durante nueve días, para establecer la presencia o la ausencia de los respectivos hongos inoculados y su crecimiento. Todo este procedimiento se llevó a cabo tres veces.

Seguimiento del proceso infectivo de Fusarium sp. en uchuva

Como en las pruebas anteriores, la inoculación se realizó sumergiendo las raíces en suspensiones de esporas. En este ensayo, nueve plantas de 20 ± 1 cm de longitud por tratamiento fueron evaluadas durante nueve semanas. Una vez inoculadas 5 min en la suspensión de esporas, se mantuvieron en bandeja de propagación durante ocho días y entonces fueron trasplantadas a materas de 1 kg. El sustrato empleado fue suelo y cascarilla de arroz (2:1) previamente humedecido y esterilizado a 121°C , 15 atm durante 25 minutos. Las plantas fueron ubicadas al aire libre, irrigadas una vez al día a saturación. Se aplicó fertilización cada tres semanas por irrigación con N-P-K a 1000 ppm. Las plantas fueron distribuidas al azar en el sitio de experimentación. Este experimento se repitió tres veces.

El experimento se modificó y se realizó utilizando el método de inoculación con salvado y grano. La modificación consistió en que el suelo fue inoculado con el hongo producido sobre una mezcla de salvado y granos de trigo, la cual se mezcló con el suelo a una proporción mezcla:suelo de 1:100; así se garantizó una carga de inóculo muy alta (10^5 UFC/g de suelo). En el control se mezclaron 10 g de trigo estéril. Este experimento se repitió tres veces.

Para determinar el avance de los diferentes hongos por el sistema vascular de las plantas, semanalmente se indexó una planta por tratamiento durante un período de

nueve semanas. La zona evaluada comprendía 2 cm por debajo del cuello radicular y 2 cm por encima.

Cada semana, una planta de cada tratamiento fue escogida al azar y removida del sustrato cuidadosamente para evitar daños al material. Las raíces de cada planta fueron lavadas con agua corriente para eliminar los restos de sustrato. Una vez realizado este lavado, se podó el paquete radicular para dejar expuesta la raíz principal. Esta se seccionó para obtener la porción de 4 cm, 2 cm por encima y debajo de la corona, la cual fue esterilizada al sumergirla en hipoclorito al 0,2% durante 3 minutos, seguido por dos lavados con ADE durante 2 minutos cada uno. Una vez esterilizados, cada fragmento de 4 cm fue dividido en 8 fragmentos de 2,5 mm de longitud, los cuales fueron inoculados en APD 1/4 (Figura 7A).

En estos montajes se realizaron observaciones macroscópicas (estereomicroscopio) y microscópicas (microscopio de luz) durante los primeros ocho días para establecer la presencia del hongo, su crecimiento a partir del sistema vascular, el avance desde la zona radicular hacia la parte aérea de la planta y para corroborar que el hongo que emergiera de las muestras fuera el correspondiente al inoculado previamente en cada tratamiento.

Elaboración de la escala de severidad

Se realizó utilizando el método de inoculación con salvado y grano, con el mismo diseño experimental que se muestra arriba. En este caso se modificó utilizando grupos de 10 plantas, con 2 pares de hojas expandidas, el cual es un tamaño comercial, útil para trasplantes. Este experimento fue realizado tres veces.

Debido a la falta de descripciones detalladas de los síntomas esperados, se realizaron observaciones conducentes a la determinación de los síntomas diferentes al marchitamiento descendente, ya que este último es un síntoma terminal. El monitoreo de las plántulas se realizó diariamente, pero se escogió la observación de cada séptimo día como descriptor, debido a que no era evidente la diferencia entre dos observaciones diarias. A partir de estas observaciones, se elaboró una escala diagramática de cinco grados, la cual fue evaluada en una repetición del experimento realizada posteriormente y en el campo, con observaciones propias y del Ing. Carlos Ramírez de CIDELA.



Figura 7. Aislamiento de *Fusarium* sp. a partir de muestras de raíz. A. Muestras de raíz con tres días de incubación; 1 y 2 posibles *Fusarium* para aislar. B. Hongo aislado (Sánchez y Forero, 2009).



RESULTADOS

Aislamiento de hongos de la raíz de uchuva en laboratorio

De las muestras obtenidas en las diferentes localidades se aislaron en total 50 hongos correspondientes al género *Fusarium* (Figura 7).

Clasificación de aislados

Los aislamientos resultaron pertenecer mayoritariamente a la especie *F. oxysporum* con un 92% (46 aislamientos) y le siguieron 4 aislamientos pertenecientes a la especie *F. solani* (8%). Las características observadas se ilustran en las Figuras 8, 9, y 10, respectivamente.

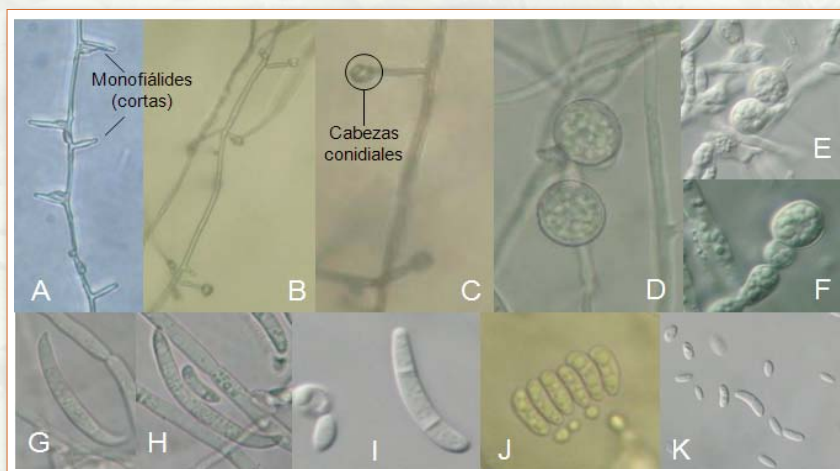


Figura 8. Características morfológicas para aislados de *F. oxysporum*. A-C. Monofialides (400x) D-F. Clamidosporas (1000x) G-H. Macroconidias (1000x) I. Mesoconidias (1000x) J-K. Microconidias (1000x) (Sánchez y Forero, 2009).

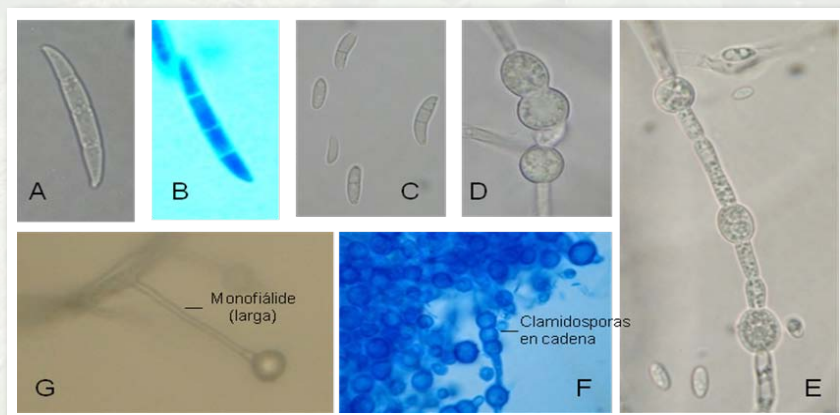


Figura 9. Características morfológicas para aislados de *F. solani*. A-B Macroconidias (1000x) C. Microconidias (1000x) D-E y F. Clamidosporas (1000x) E. Clamidosporas (1000x) G. Monofialide (400x) (Sánchez y Forero, 2009).

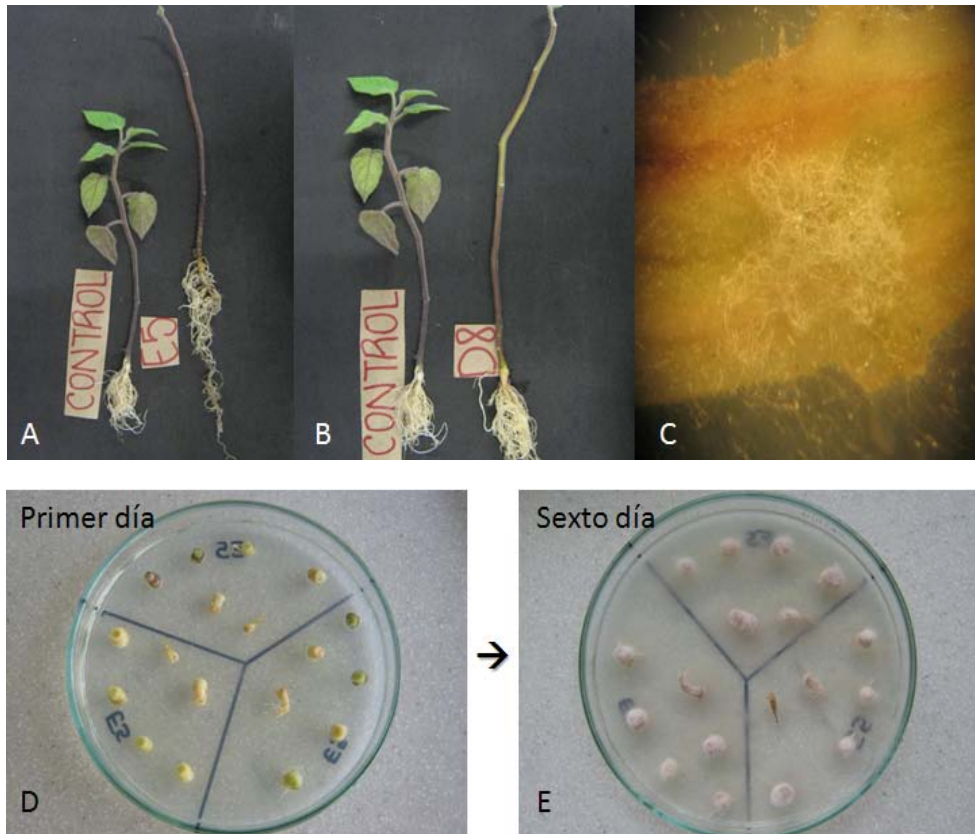


Figura 10. Pasos de las pruebas de patogenicidad. A-B Vista de plantas inoculadas. C. Observación en estereoscopio del crecimiento de micelio en corte longitudinal. D-E. Montaje de siembra de segmentos del tejido cercano al cuello radicular de una planta inoculada (Sánchez y Forero, 2009).

Elaboración de la escala de severidad

Luego de recabar la información necesaria, se determinó una escala que permite medir la severidad de la enfermedad inducida por *F. oxysporum* y otras especies de *Fusarium* sobre uchuva. Esta escala es mostrada a continuación (Figuras 11 y 12) y es ilustrada con las plantas del primer ensayo, por razones pedagógicas.

CONCLUSIONES

Se encontraron aislamientos que morfológicamente fueron clasificados como *Fusarium solani*; estos produjeron el síndrome de marchitez vascular en uchuva, lo que hasta el momento no había sido reportado para este cultivo.

La elaboración de una escala diagramática y gráfica permitió identificar y describir los síntomas causados por los aislamientos de *Fusarium* y detallar el progreso de la enfermedad en uchuva. Su utilización por parte de agrónomos e investigadores ha mostrado ser de utilidad en la detección temprana y la descripción precisa.



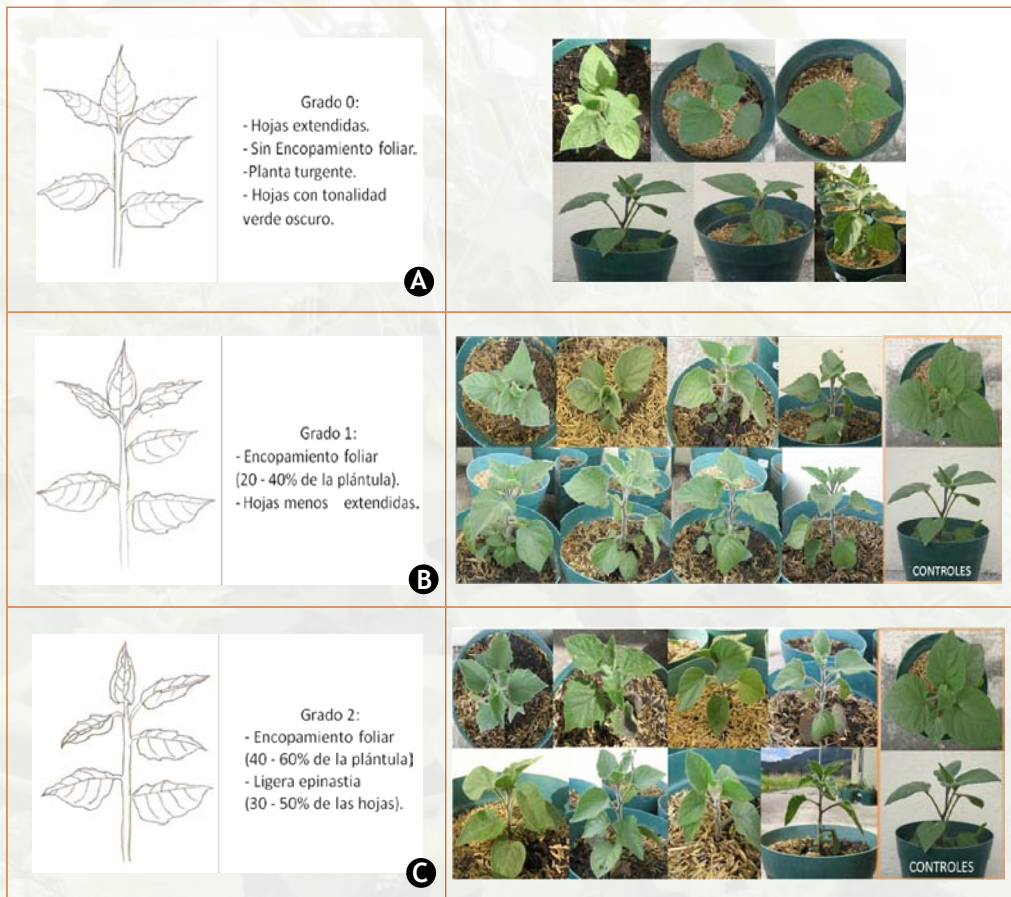


Figura 11. A. Grado cero en escala diagramática para fusariosis en uchuva. Nótese el color de las hojas, así como la posición de la lámina foliar respecto al eje central de la planta. B. Grado uno en escala diagramática para fusariosis en uchuva. Nótese la posición de la lámina respecto al eje central de la planta y los bordes levantados en forma de copa de las hojas más jóvenes. C. Grado dos en escala diagramática para fusariosis en uchuva. Nótese la posición de la lámina respecto al eje central de la planta (epinastia leve a moderada) (Sánchez y Forero, 2009).

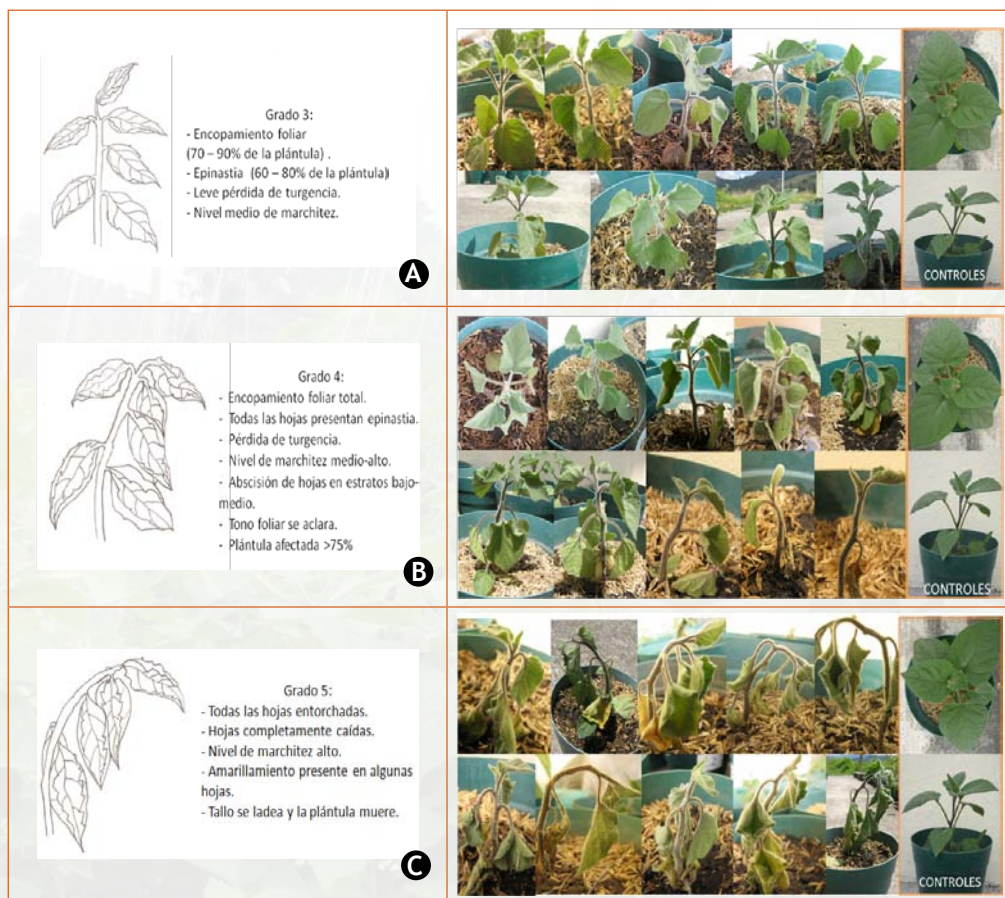


Figura 12. A. Grado tres en escala diagramática para fusariosis en uchuva. Nótese la posición de la lámina respecto al eje central de la planta (epinastia marcada) y los bordes levantados en forma de copa de las hojas más jóvenes (pérdida de turgencia notoria). B. Grado cuatro en escala diagramática para fusariosis en uchuva. C. Grado cinco en escala diagramática para fusariosis en uchuva. Nótese que solo permanecen las hojas apicales de la planta, debido a la defoliación que se presenta (Sánchez y Forero, 2009).



LITERATURA CITADA

- Beckman, C. H. The Nature of Wilt Diseases of Plants. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 175 pp. 1987.
- Corporación Colombia Internacional. Sistema de Inteligencia de Mercados. Perfil producto No.34, Bogotá, Colombia. Noviembre de 2005.
- Fravel, D.; Olivain, C. Y.; Alabouvette, C. *Fusarium oxysporum* and Its Biocontrol. New Phytologist. 157 (3) : 493-502. 2003.
- Gordon, T. R.; Martyn, R. D. The Evolutionary Biology of *Fusarium oxysporum*. Annual Reviews of Phytopathology. 35 : 111-28. 1997.
- Legiscomex. Inteligencia de Mercados. Frutas Exóticas de Colombia.
http://www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/est_col_frutas_exot_7.pdf accedida el 16 de Marzo de 2008.
- Leslie, J. F.; Summerell, B. A. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. 2006.
- Nelson, P. E.; Dignani, M. C.; Anaissie, E. J. Taxonomy, Biology and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. Clinical Microbiology Reviews. 7 (4) : 479-504. 1994.
- Nelson, P. E.; Tousson, T. A.; Marasas, W. F. O. *Fusarium* species. A Illustrated Manual for Identification. University Park. Pennsylvania State University Press. 1983.
- Olivain, C. y Alabouvette, C. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with non-pathogenic strain. New Phytologist. 141 (3): 497-510. 1999.
- Sánchez, M. T. y Forero, P. A. Reporte de especies del género *Fusarium* asociadas a la uchuva (*Physalis peruviana*) y descripción de la etiología relacionada con la fusariosis. Trabajo de grado de biología. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, D.C. 97 pp. 2009.
- Schumann, G. L. Y.; D'Arcy, C. J. Essential Plant Pathology. APS Press. 2006.